

Oliveiros Dias Jr.

**Filogenética e filogeografia das espécies de macroalga vermelha
calcária do gênero *Amphiroa* (Corallinales, Rhodophyta) na
Austrália**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi submetido à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas em 30 de novembro de 2017. Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Gurgel.

Florianópolis
2017

Dias Junior, Oliveiros

Filogenética e filogeografia das espécies de macroalga vermelha calcária do gênero *Amphiroa* (Corallinales, Rhodophyta) na Austrália / Oliveiros Dias Junior ; orientador, Carlos Frederico Deluqui Gurgel, 2017.
57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. *Amphiroa*. 3. Filogenética molecular. 4. Filogeografia. 5. Recifes de corais da Austrália. I. Gurgel, Carlos Frederico Deluqui. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Oliveiros Dias Jr.

**Filogenética e filogeografia das espécies de macroalga vermelha
calcária do gênero *Amphiroa* (Corallinales, Rhodophyta) na
Austrália**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas e aprovado
em sua forma final pela Coordenadoria do Curso de Ciências Biológicas
da UFSC

Florianópolis, 30 de novembro de 2017.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Carlos Frederico Deluqui Gurgel, Dr.

Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Norma Machado da Silva, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Sérgio Ricardo Floeter, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus antepassados, aos contemporâneos e às gerações vindouras que tenham amor à vida e curiosidade por aprender seus caminhos, descobrindo cada vez mais a ignorância que vem junto com cada descoberta.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer imensamente pela vida, sempre cheia de surpresas e que me deu oportunidade de estudar Biologia, a ciência que estuda a vida em seus constituintes, processos e relações. Agradeço a toda aventura da vida neste planeta, a toda cadeia de ancestralidade que chegou ao *Homo sapiens sapiens* e dos quais vieram os meus ancestrais.

Agradeço aos meus pais Oliveiros Dias e Marilina Bernal Penteado Dias, aos meus irmãos e parentes, além dos amigos e colegas que me apoiaram imensamente, conscientemente ou não, para a consecução deste curso.

Agradeço à UFSC, que sempre me acolheu e proporcionou acesso a ótimos professores e as condições físicas necessárias para o aprendizado de excelência. Muitos foram os professores que me ajudaram neste curso e para os quais são poucas as palavras de agradecimento por todo o conhecimento e experiência compartilhados comigo.

Agradeço imensamente aos professores da banca avaliadora deste trabalho, professora Dra. Norma Machado da Silva (LAPOGE / BEG / UFSC), professor Dr. Sérgio Ricardo Floeter (LBMM / ECZ / UFSC), e meu amigo e orientador, professor Dr. Carlos F. Deluqui Gurgel (LAFIC / BOT / UFSC) pelas suas palavras, sugestões e correções, tão necessárias ao verdadeiro aprendizado.

Agradeço ao CNPq, que durante o curso me deu apoio financeiro através da bolsa do PIBIC. Este pesquisa também foi financiada pelo *Census of Coral Reef Life – Australia*, a *Australia Biological Resource Study (ABRS, grant 602-09)*, e contou com apoio e infraestrutura do *Department for Environment, Water and Natural Resources of South Australia (DEWNR)*, e da *University of Adelaide, SA, Australia*.

RESUMO

A partir de um conjunto de 93 seqüências de DNA de macroalgas calcáreas do gênero *Amphiroa*, coletadas ao longo da costa da Austrália, foram realizadas análises filogenéticas e filogeográficas de suas populações. O trabalho foi direcionado a responder as seguintes questões: (1) Quantas espécies do gênero *Amphiroa* existem nos dois maiores ecossistemas de recifes de coral na Austrália: a Grande Barreira de Corais (GBC) na costa leste e o recife de Ningaloo na costa oeste? (2) Qual a relação evolutiva entre elas? (3) Existem espécies novas, crípticas, pseudo-crípticas, criptogênicas ou introduzidas neste gênero na Austrália? (4) Existe estrutura genética entre as populações de uma mesma espécie ao longo da Grande Barreira de Corais Australiana e entre as costas leste e oeste da Austrália? Os resultados indicaram a existência de pelo menos 14 espécies molecularmente diferentes, 7 além das já reconhecidas morfologicamente, evidenciando, portanto, a existência de espécies crípticas ou, no mínimo, pseudocrípticas. As análises indicaram a presença de um “*selective sweep*”, provavelmente associado a um ‘*bottleneck*’ recente, na região de *Heron Island*, sul da GBC na população de *Amphiroa crassa*. Foi detectado para *A. foliacea*, a existência do isolamento genético entre as populações do leste e oeste da Austrália. Lizard Island, região norte da GBC e Ningaloo apresentaram os maiores índices de biodiversidade taxonômica (= inter-específica) e genética (= intra-específica) para esta espécie.

Palavras-chave: *Amphiroa*. Ecologia molecular. Ecologia marinha. Genética de populações. Filogenética molecular. Filogeografia. Bioinformática. Recifes de corais.

ABSTRACT

Phylogenetic and phylogeographic analyzes from a set of 93 newly generated *cox1* DNA sequences of the calcareous macroalgal genus *Amphiroa*, collected along the Australian coast, were carried out. The work was directed to answer the following questions: (1) How many species of the genus *Amphiroa* exist in the two largest coral reef ecosystems in Australia: the Great Barrier Reef (GBC) on the east coast, and the Ningaloo Reef, on the west coast? (2) What are the evolutionary relations among them? (3) Are there any new, cryptic, pseudo-cryptic, cryptogenic, or introduced *Amphiroa* species in Australia? (4) Is there genetic structure between populations of the same species along the Great Australian Barrier Reef and between the east and west coasts of Australia? Results indicated the existence of at least 14 molecularly different species, 7 besides those already recognized morphologically, evidencing the existence of cryptic or, at least, pseudocryptic species. The analyzes indicated the presence of a selective sweep, probably associated with a recent bottleneck, in the region of Heron Island, southern GBC for *Amphiroa crassa* populations. For *A. foliacea*, the existence of a clear genetic isolation between east and west coast populations was detected. Lizard Island, northern GBC, and Ningaloo Reef presented the highest rates of taxonomic (= inter-specific) and genetic (= intra-specific) biodiversity for the genus.

Keywords: *Amphiroa*. Molecular ecology. Marine ecology. Population genetics. Molecular phylogenetics. Phylogeography. Bioinformatics. Coral reefs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da Austrália com as localidades onde foram coletadas as amostras.....	43
Figura 2 - Árvore filogenética encontrada para o gênero <i>Amphiroa</i> na Austrália.....	44
Figura 3 - Rede de haplótipos de <i>Amphiroa crassa</i>	45
Figura 4 - Rede de haplótipos de <i>Amphiroa foliacea</i>	46
Figura 5 - Mapa da plataforma continental da Austrália.....	47
Figura 6 - Mapa da média das amplitudes das marés na costa da Austrália....	48
Figura 7 - Mapa com a configuração das correntes marinhas na costa da Austrália.....	49
Figura 8 - Mapa com a média das temperaturas na superfície do mar ao redor da Austrália entre os anos de 1961 e 1990.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índices de diversidade genética por população de *Amphiroa crassa* e *A. foliacea* (algas marinhas vermelhas) calculados pelo software

DnaSP 51

Tabela 2 - Análise de isolamento genético entre populações (F_{ST}) e estimativa de fluxo gênico entre estas (Nm) (HUDSON et cols, 1992)..... 52

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	<i>Amphiroa</i> no mundo	27
1.2	<i>Amphiroa</i> na Austrália	28
1.3	A Sistemática Molecular e a Filogeografia.....	28
1.4	Justificativa e objetivos.....	30
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1	As origens das amostras, as sequências de DNA, e o processo de bioinformática	31
2.1.1	As origens das amostras.....	31
2.1.2	As sequências de DNA	32
2.1.3	O processo de bioinformática.....	32
2.2	Bioinformática na Filogenética	34
2.3	Bioinformática na Filogeografia	34
3	RESULTADOS.....	34
3.1	Filogenia - Árvores filogenéticas, diferentes espécies, diversidade.....	34
3.2	Filogeografia de <i>A. crassa</i> e <i>A. foliacea</i>.....	35
3.2.1	<i>Amphiroa crassa</i>.....	35
3.2.2	<i>Amphiroa foliacea</i>.....	36
4	DISCUSSÃO.....	37
4.1	Respostas aos objetivos específicos do trabalho	37
4.1.1	Quantas espécies do gênero <i>Amphiroa</i> realmente existem na GBC?	38
4.1.2	Existem espécies novas, crípticas, pseudo-crípticas, criptogênicas ou introduzidas destes 2 gêneros?	38
4.1.3	Qual a relação evolutiva entre elas?	38
4.1.4	Existe estrutura genética entre as populações de uma mesma espécie ao longo da Grande Barreira de Corais Australiana e entre a costas leste e oeste da Austrália?	39
4.2	Limitações do trabalho	41

4.3	Consequências ecológicas e acadêmicas.....	41
4.4	Recomendações para o futuro.....	42
	FIGURAS	43
	TABELAS.....	51
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Amphiroa* no mundo

Amphiroa é um gênero de alga marinha vermelha (Rhodophyta) calcárea, articulada, que cresce de forma epifítica ou epilítica em regiões bentônicas de mares tropicais e temperados-quentes, com algumas espécies também presentes em águas temperadas-frias. (HARVEY et al., 2013). Espécies de *Amphiroa* variam em tamanho de alguns milímetros a 30 cm de altura (GUIRY, 2017). Apesar de 230 espécies e táxons infragenéricos distintos de *Amphiroa* existirem na literatura (i.e., subespécies, variedades, e formas), atualmente são reconhecidas apenas 55 espécies em todo o mundo (GUIRY, 2017). A existência de muitos tipos nomenclaturais não válidos é resultado direto das espécies deste gênero apresentarem grande variedade fenotípica de caracteres vegetativos tais como forma, comprimento e largura dos genículos e intergenículos (e.g., cilíndricos ou achatados); comprimento e largura das células medulares e corticais; comprimento e largura das estruturas reprodutivas tais como conceptáculos.

O gênero *Amphiroa* foi originalmente descrito por Lamouroux (1812). Sua classificação corresponde a uma eucariota do reino Plantae, subreino Biliphyta, Filo Rhodophyta, Subfilo Eurhodophytina, classe Florideophyceae, ordem Corallinales, família Corallinaceae, subfamília Lithophylloideae, tribo Amphiroeae.

Mais especificamente sobre a distribuição de *Amphiroa crassa* e *Amphiroa foliacea* (mais discutidas neste trabalho), de acordo com o banco (internacional) de dados do *Algae Base* (www.algaebase.org), *Amphiroa crassa* distribui-se pelas regiões: do Pacífico Sul (Chile, América do Sul); Indonésia e Filipinas (Sudeste Asiático), Austrália e Nova Zelândia; ilhas do Pacífico (Samoa Americana, Polinésia Central, Fiji, Nova Caledônia, Samoa e arquipélago Samoano); Ilhas Antárticas e Sub Antárticas (Fuegia). *Amphiroa foliacea* distribui-se pelas regiões: América do Norte (México); América Central (Costa Rica, El Salvador e Panamá); Ilhas do Oceano Índico (Comoros e Mayotte, Ilhas Laccadivas e ilhas Seychelles); África (Kenya, Madagascar); Sudoeste da Ásia (Índia e Sri Lanka); Ásia (China, Japão, Mar do Sul da China, Taiwan, Ilha Yonaguni; Sudeste Asiático (Indonésia, Malásia, Cingapura, Vietnam); Austrália, Nova Zelândia e Papua Nova Guiné; Ilhas do Pacífico (Samoa Americana, Polinésia Central, Federação dos Estados da Micronésia, Fiji,

Polinésia Francesa, Hawaii, Ilhas Marianas, Nova Caledônia, República do Palau, Arquipélago Samoano, Ilhas Salomão) (GUIRY, 2017).

1.2 *Amphiroa* na Austrália

A primeira monografia de *Amphiroa* (Corallinaceae, Rhodophyta) na Austrália foi baseada no conceito morfológico-anatômico de espécie e realizado por Womersley & Johansen em WOMERSLEY (1996). Naquele trabalho apenas espécimes da costa sul da Austrália foram analisados. Recentemente e ainda baseado em dados puramente morfológicos, uma revisão de *Amphiroa* foi realizado na Austrália por HARVEY et al. (2013). HARVEY et al. (2013) confirmou a ocorrência de nove espécies (*A. anceps*, *A. beauvoisii*, *A. crassa*, *A. exilis*, *A. foliacea*, *A. fragilissima*, *A. gracilis*, *A. klochkovana*, *A. tribulus*) na Austrália e fornece uma base para estudos posteriores de sistemática molecular. HARVEY et al. (2013) realizou-se uma análise comparativa de 285 espécimes de 121 localidades, que, juntamente com material de herbários, produziu provas claras de que nove caracteres, associados ao sistema vegetativo e tetrasporangial, são diagnosticamente significativos ao nível de espécie. HARVEY et al. (2013) apresentou detalhes de cada espécie ao longo de uma chave de identificação, com dados de espécimes de tipo (epitipo), além de comparações de espécies e notas biogeográficas. *A. foliacea* foi epitificada.

1.3 A Sistemática Molecular e a Filogeografia

Desde o momento da descoberta do modelo da dupla hélice do DNA, inaugurou-se uma nova fase do entendimento da sistemática em Biologia, até mesmo o conceito de espécie e o que diferencia uma espécie de outra a nível molecular, trouxeram avanços e desafios. De acordo com BUENO-SILVA (2012):

“Atualmente, é possível destacar quatro tipos principais de conceito de espécie: (1) conceito tipológico ou morfológico, (2) conceito biológico, (3) conceito evolutivo e (4) conceito filogenético. Apesar da ampla discussão a respeito da validade dos diferentes conceitos de espécie, dados genéticos recentes parecem favorecer o conceito filogenético de espécie. O conceito filogenético de

espécie vem conquistando cada vez mais espaço na comunidade científica, principalmente por ser menos restritivo que o conceito biológico de espécie e permitir o teste de hipóteses filogenéticas (sensu WHEELER, 1999), contribuindo, dessa forma, para estudos sobre a evolução de espécies.” (p.160).

Com o avanço das tecnologias da informação, implementam-se ferramentas cada vez mais complexas e precisas para realizar análises filogenéticas e filogeográficas, podendo-se comparar organismos e grupos de organismos em vários níveis de complexidade, tendo como base os materiais genéticos dos mesmos. Assim surge a Sistemática Molecular, em que podemos comparar sequências de ácidos nucleicos, com um número elevado de caracteres, em que posso comparar seqüências completas ou partes das mesmas.

A sistemática molecular trouxe a possibilidade de corroborar ou trazer resolução de espécies para grupos tradicionais já classificados morfologicamente, permitindo uma maior acurácia, que também pode ser útil em casos onde há carência de dados morfológicos. Ela também pode indicar contextos onde são necessários estudos morfológicos mais críticos e rigorosos. Com esta técnica, podem ser reveladas espécies crípticas e pseudocrípticas. Espécies crípticas são diferenciadas somente em nível molecular. As pseudocrípticas possuem diferenças muito sutis que podem ser reveladas quando a análise morfológica se realiza junto à, ou guiada pelos resultados das análises moleculares.

A preocupação cada vez maior com a ecologia e a preservação de diversos seres vivos, impulsionou o desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção e análise dos dados genéticos. A diferenciação entre indivíduos, populações e espécies exige análises baseadas em suas estruturas genéticas. A ecologia também procura uma análise do seu processo histórico, sua evolução, seu desdobramento no tempo e no espaço, envolvendo outras áreas do conhecimento como a paleontologia, a geologia e outras -- a filogeografia e a biogeografia avançam neste sentido. No Brasil, e sobretudo no ambiente marinho, a ecologia molecular é um campo de estudo relativamente recente.

Com critérios analíticos cada vez mais apurados e o aumento vertiginoso da quantidade de informações genéticas a serem analisadas, os estudos e pesquisas só foram possibilitados pelos avanços no campo da informática, mais especificamente da bioinformática. Assim

desenvolveram-se novos programas e plataformas de trabalho computacionais adequados à análise filogenética e filogeográfica.

O conceito de filogeografia surgiu com o trabalho de AVISE et al (1987), sendo definida como “o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas.” (MARTINS & DOMINGUES, 2011).

De acordo com FLOETER et al. (2009, p.422):

“A filogeografia é uma linha de pesquisa que estuda os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, incluindo aquelas em nível intraespecífico. A filogeografia propõe uma relação entre a genética de populações e a sistemática (e, consequentemente, a organização espacial das populações. Esses estudos baseiam suas hipóteses nos processos de vicariância, dispersão e extinção, e estabelecem relações entre táxons e/ou entre áreas.”

De acordo com MIRANDA & MARQUES (2011):

“Estudos em biogeografia marinha são incipientes para a maioria dos táxons marinhos, principalmente devido às dificuldades de caracterização e compreensão das barreiras que determinam cladogêneses dos grupos.” (p.41).

PALUMBI (1994, p.566) e HU et al. (2011, p.3894) alertam para o fato que as oscilações dos níveis dos mares durante o Pleistoceno e os processos tectônicos associados influenciaram a abundância e a distribuição de muitos táxons marinhos. Juntando-se a esses fatores, houveram variações nos gradientes térmicos longitudinais. Como resultado, ainda que as populações estejam bem conectadas hoje pelo fluxo gênico (alélico), elas podem ter sido isoladas num passado muito recente. São várias as evidências indicando que os fatores que moldam a dinâmica da população no espaço-tempo, assim como os padrões de distribuição da taxa marinha, variam com a latitude biogeográfica, comportamento pelágico e regimes oceanográficos.

1.4 Justificativa e objetivos

O presente trabalho de pesquisa vai ao encontro da preocupação mundial com a diminuição da biodiversidade marinha devido às

mudanças climáticas e a acidificação dos oceanos (HENDRIKS et al., 2010; DUPONT et al. 2010; KUFFNER et al., 2008; MARTIN et al., 2009; HOEGH-GULDBERG et al., 2007). Essas mudanças ameaçam espécies que dependem de um equilíbrio nas taxas de carbonato de cálcio presente no meio. Dentre as espécies ameaçadas encontram-se as macroalgas marinhas calcáreas do gênero *Amphiroa* (Corallinales, Rhodophyta) presentes nas comunidades bentônicas tropicais no mundo, portanto, também presentes no Brasil (HARVEY et al., 2013; TORRANO-SILVA, 2015). Ainda que sejam analisadas as populações de um gênero (*Amphiroa*), esse mesmo delineamento de pesquisa (i.e., métodos analíticos) pode ser aplicado a outros organismos marinhos e terrestres que envolvam análise de dados genéticos, sobretudo aqueles formados por sequência de DNA.

Objetivou-se realizar uma análise filogenética e filogeográfica das populações de *Amphiroa* a partir do material coletado durante 3 anos (2008-2010) em vários pontos da costa australiana. A análise objetivou responder as seguintes questões:

(1) Quantas espécies do gênero *Amphiroa* existem na GBC e no Recife de Ningaloo?

(2) Quais são as relações evolutivas (filogenéticas) entre elas?

(3) Existem espécies novas, crípticas, pseudo-crípticas, criptogênicas ou introduzidas de *Amphiroa* na Austrália?

(4) Existe estrutura genética entre as populações de uma mesma espécie ao longo da Grande Barreira de Corais e entre a costas leste e oeste da Austrália?

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 As origens das amostras, as sequências de DNA, e o processo de bioinformática

2.1.1 As origens das amostras

Realizou-se uma vasta coleta de espécimes de *Amphiroa* no sublitoral de duas regiões de grande representatividade pela sua diversidade biológica -- a Grande Barreira de Corais da Austrália (GBC) e o recife coralíneo à oeste da Austrália, o recife *Ningaloo* (Figura 1). Estas coletas foram realizadas utilizando-se SCUBA, entre 3 e 20 metros de profundidade, pelo grupo de pesquisas do Professor Carlos F. D. Gurgel, então *lecturer* na Universidade de Adelaide, Austrália. As coletas ocorreram principalmente durante expedições de 21 dias cada, em 3

regiões distintas da Austrália: o grupo de recifes de *Heron Island* no sul da GBC; o grupo de recifes de *Lizard Island* ao norte da GBC; e ao longo do Recife de *Ningaloo*, costa oeste da Austrália. Cada região foi amostrada 1 vez por ano ao longo de 3 anos totalizando 9 expedições realizadas entre 2008 e 2010. Outras coletas aleatórias foram adicionadas as acima citadas. Todo material coletado foi limpo, seco em sílica gel ou ao ar livre com o auxílio de ventiladores, identificado morfológicamente e as exsicatas foram depositadas em herbário e registradas no *Australia Virtual Herbarium* (<https://avh.chah.org.au/>). Todo o material coletado faz parte do *Census of Coral Reef Life* (CReefs), projeto financiado pela *Mellon Foundation*, *BHP Billiton Ltd.*, e *AIMS Australia* (<http://www.aims.gov.au/creefs>).

2.1.2 As sequências de DNA

Todo material coletado identificado morfológicamente foi sequenciado usando o marcador COI (ou *cox1*) para barcode de DNA de algas vermelhas (SAUNDERS, 2005). O sequenciamento seguiu os protocolos descritos em GULBRASEN et al. (2012).

2.1.3 O processo de bioinformática

O trabalho iniciou com o recebimento das sequências de COI (citocromo oxidase I) já produzidas para amostras de *Amphiroa* da Austrália. A partir das amostras já sequenciadas, foram redefinidos os códigos de denominação (nomes) apropriados a cada indivíduo sequenciado. Isto facilita a direta identificação e oferece imediata informação geográfica das amostras a partir dos resultados apresentados pelos programas de análise. Os nomes possuem um radical referente à região da coleta da amostra (por exemplo, LIZ, HER, NIN, caso as amostras fossem originais de *Lizard Island*, *Heron Island* ou *Ningaloo* respectivamente, Fig. 1) e um número único de referência, o mesmo utilizado nos bancos de dados internacionais (GenBank e *Australia Virtual Herbarium*). Por exemplo, ADA90667.Afoli.HER (*Amphiroa foliacea*, da região de Heron Island, identificada como ADA-90667 no *Australia Virtual Herbarium* - AVH). Mais de 122 sequências iniciais foram selecionadas, editadas e renomeadas. Algumas apresentaram problemas de identificação, amostragem e/ou sequenciamento e foram descartadas, restando 93 amostras de *Amphiroa*, destas, 68 correspondem somente a *A. crassa* ou *A. foliacea*, que constam no AVH ou estão referidas no trabalho de HARVEY et al. (2013), como, por exemplo,

ADA87681.Afoli.NIN, o epítipo de *A. foliacea* catalogado por HARVEY et al. (2013, p.104). O alinhamento final das amostras foi realizado utilizando os programas MEGA 7 (TAMURA et al, 2013) e GENEIOUS 5.5.9 (DRUMMOND et al., 2011).

As análises iniciais já trouxeram à tona problemas de incompatibilidade entre vários programas de análise disponíveis. Os dados utilizados estavam em vários formatos: FASTA, MEGA, e NEXUS. Para facilitar o trabalho, sempre que necessária uma conversão de dados, foi utilizado o programa GENEIOUS 5.5.9.

As amostras de DNA costumam apresentar problemas (baixa qualidade das leituras) no início e no final das sequências. Assim sendo, foram realizadas edições, alguns cortes no início e no final de cada sequência e foram realizados novos realinhamentos. Como parâmetros de comparação, foram selecionados como grupos externos, sequências de táxons filogeneticamente próximos a *Amphiroa* mas não pertencentes a este gênero, a partir do GenBank (BENSON et al, 2013) do *National Centre of Biotechnological Information* dos EUA (NCBI Resource, 2013). As sequências adicionadas foram: *Lithophyllum kotschyannum*, *Lithophyllum margaritae* e *Titanoderma prototypum*.

O modelo de evolução molecular foi obtido através do uso do programa jModelTest2 (DARRIBA et al, 2012), disponível na plataforma virtual CIPRES (MILLER et al, 2010), da Universidade de San Diego (EUA). O melhor modelo identificado para o alinhamento final de COI de *Amphiroa* foi o HASEGAWA et al. (1985) com sítios variáveis modelados via função gamma, HKY+G.

As amostras de DNA costumam apresentar problemas (baixa qualidade das leituras) no início e no final das sequências. Assim sendo, foram realizadas edições, alguns cortes no início e no final de cada sequência e foram realizados novos realinhamentos. Como parâmetros de comparação, foram selecionados como grupos externos, sequências de táxons filogeneticamente próximos a *Amphiroa* mas não pertencentes a este gênero, a partir do GenBank (BENSON et al, 2013) do *National Centre of Biotechnological Information* dos EUA (NCBI Resource, 2013). As sequências adicionadas foram das espécies, *Lithophyllum kotschyannum*, *Lithophyllum margaritae* e *Titanoderma prototypum*.

O modelo de evolução molecular foi obtido através do uso do programa jModelTest2 (DARRIBA et al, 2012), disponível na plataforma virtual CIPRES (MILLER et al, 2010), da Universidade de San Diego (EUA). O melhor modelo identificado para o alinhamento final de COI de *Amphiroa* foi o HASEGAWA et al. (1985) com sítios variáveis modelados via função Gamma, HKY+G.

2.2 Bioinformática na Filogenética

Com as sequências alinhadas e o modelo de evolução molecular determinado, seguiu-se para a análise e obtenção das árvores filogenéticas, implementadas através dos métodos de *Neighbour Joining* (NJ) e *Bayesian Analysis* (BA). Foram utilizados os programas MEGA 7 (TAMURA et al, 2013) e GENEIOUS 5.5.9 para gerar uma árvore pelo critério de NJ. Depois utilizou-se o MrBayes 3.4 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) presente na plataforma CIPRES (MILLER et al, 2010) para a BA. Nesta foram rodadas 10 milhões de gerações, amostrando-se uma árvore a cada 1000 gerações, obtendo-se ao final, 10 mil árvores. A árvore de consenso foi obtida pelo GENEIOUS tendo como critério a ‘regra da maioria’ (*Majority Rule*) além de realizar um ‘corte’ (*burn-in*) nos 25% iniciais das árvores. Para uma melhor visualização da árvore de consenso utilizou-se o programa Figtree 1.4.2 (RAMBAUT, 2009).

2.3 Bioinformática na Filogeografia

A análise da genética de populações de *A. crassa* e *A. foliacea* foi realizada no programa DnaSP v.6.0 (ROZAS et al., 2003). Essas espécies foram as escolhidas porque eram as que tinham maior representatividade no espaço amostral. O DnaSP, a partir dos dados das sequências de nucleotídeos, realiza análises de polimorfismo, calcula vários índices interessantes à análise genética de populações, regiões de semelhança, desequilíbrio por *linkage*, recombinação, fluxo gênico (alélico) e outros parâmetros, além de realizar alguns testes de neutralidade: Fu e Li (FU & LI, 1993); Hudson, Kreitman e Aguadé (HUDSON et al., 1987); McDonald e Kreitman (McDONALD & KREITMAN, 1991) e, por último, o teste D de Tajima (TAJIMA, 1989).

A rede de haplótipos para *A. crassa* (Fig. 3) e para *A. foliacea* (Fig. 4), foram geradas utilizando-se o programa TCS 1.21 (CLEMENT et al, 2000) e as imagens foram geradas e finalizadas com o pacote Office (Microsoft).

3 RESULTADOS

3.1 Filogenia - Árvores filogenéticas, diferentes espécies, diversidade

Ao todo foram identificadas 14 espécies filogeneticamente (molecularmente) distintas de *Amphiroa* (Figura 2). A região de *Lizard Island* (costa NE da Austrália) apresentou a maior diversidade taxonômica com 5 espécies diferentes: *A. foliacea*, *A. fragilissima*, *A. crassa*, e, pela divergência na sequência de COI, duas espécies crípticas ou pseudo-crípticas (*Amphiroa spl* e *Amphiroa sp2*). *Ningaloo* apresentou 3 espécies: *A. foliacea*, *A. anceps* e *A. exilis*. A região de ‘*One Arm Point*’ (costa Noroeste da Austrália) que fica próxima de *Ningaloo* também apresentou 3 espécies, *A. tribulus*, *A. foliacea* e uma espécie críptica (PER7029608.Afoliacea.OneArmPoint, chamando agora simplesmente por *Amphiroa sp.*). *Heron Island* apresentou duas espécies: *A. foliacea* e *A. crassa*. A região de *Yalata* (costa Sul da Austrália) apresentou duas espécies: *A. anceps* e *A. gracilis*. E, finalmente, Perth (costa sudoeste da Austrália) apresentou uma única espécie, *A. exilis*. Cabe lembrar aqui, que o número de indivíduos amostrados não foi uniforme ao longo da costa. As coletas se concentraram em *Lizard*, *Heron* e *Ningaloo*.

3.2 Filogeografia de *A. crassa* e *A. foliacea*

Para estas análises foram consideradas somente as amostras referentes às localidades de *Lizard Island*, *Heron Island* e *Ningaloo* por possuírem um número amostral mínimo suficiente para se realizar análises filogeográficas. Todas as outras foram desconsideradas.

3.2.1 *Amphiroa crassa*

Para a análise realizada pelo DnaSP foram consideradas um total de 33 sequências: 22 em *Lizard Island* e 11 em *Heron Island*. *Ningaloo* não apresentou esta espécie. O número total de sítios ou nucleotídeos no alinhamento foi de 670. Destes, 119 foram considerados sítios polimórficos, sendo 101 considerados sítios informativos para parcimônia (*Parsimony informative sites*). A relação entre número total de haplótipos e diversidade de haplótipos (h/Hd) foi de 19 e 0.936, respectivamente. Quanto aos testes de neutralidade, os índices ‘D de Tajima’, ‘D de Fu e Li’ e ‘F de Fu’, foram respectivamente 1.191 ($P > 0.10$), 0.443 ($P > 0.10$) e 5.293. O índice de diversidade de nucleotídeos (Pi), foi de 0.085 (ver Tabela 1).

Para a análise das 22 amostras sequenciadas em *Lizard Island*, foram comparados 670 sítios de pares de base, 92 foram considerados

sítios polimórficos e 69 sítios considerados informativos. A relação h/H_d foi 14/0.931. Quanto aos testes de neutralidade, os índices ‘D de Tajima’, ‘D de Fu e Li’ e ‘F de Fu’, foram respectivamente 0.827 ($P>0.10$), -0.098 ($P>0.10$) e 3.307 respectivamente (ver Tabela 1). Como não são significativos estatisticamente, isso equivale dizer que $D=0$. Podemos então afirmar que esta população tem evoluído demograficamente em equilíbrio. Para *A. crassa*, *Lizard Island* é a região com o maior número de haplótipos, sendo a região que também apresentou o maior diversidade de espécies. Comparando-se os índices P_i para Lizard (0.060) e Heron (0.028) também percebe-se que Lizard possui uma diversidade duas vezes maior de nucleotídeos.

Foram analisadas 11 sequências de *Heron Island*, comparou-se 670 sítios de pares de base, 76 foram considerados sítios polimórficos e 3 sítios foram considerados informativos. Os valores de h e H_d foram 6 e 0.727, respectivamente. O índice P_i foi de 0.028. Quanto aos testes de neutralidade, os índices ‘D de Tajima’, ‘D de Fu e Li’ e ‘F de Fu’, foram respectivamente -2.164 ($P<0.01$), -2.581 ($P<0.02$) e 3.981 (Tabela 1). Os índices de neutralidade ‘D’ de Tajima e ‘D’ de Fu e Li encontrados em *Heron Island* foram significativos e negativos, indicando a ocorrência de eventos recentes de seleção de varredura (*‘selective sweeps’*) ou seja, uma remoção de variantes alélicas por seleção natural, ou pode ter passado por uma redução demográfica ou *‘bottleneck’* (redução aleatória recente de tamanho populacional).

A figura 3, mostra a rede de parcimônia estatística de haplótipos para as populações de *A. crassa*. A rede 1 (= grupo 1) é formada exclusivamente por haplótipos restritos a Lizard Island, a rede por 2 haplótipos restritos a Heron Island, e a rede 3 por haplótipos encontrados em ambas localidades. A presença de redes de haplótipos com distribuição geográfica restrita evidencia a presença de isolamento reprodutivo, estrutura genética, e baixo fluxo gênico entre as populações de *A. crassa* do norte e sul da GBC. Os grupos independentes podem indicar novas espécies, uma vez que por apresentarem muita divergência, não foi possível ligá-los a nenhum outro grupo.

3.2.2 *Amphiroa foliacea*

Foram analisadas um total de 33 sequências (destas, 20 em *Lizard Island*, 6 em *Heron Island* e 7 em *Ningaloo*). O alinhamento possuiu 674 nucleotídeos, sendo 99 considerados sítios polimórficos e 69 informativos para parcimônia. A relação encontrada para h/H_d foi de 23/0.960. Quanto

aos testes de neutralidade, os índices ‘D de Tajima’, ‘D de Fu e Li’ e ‘F de Fu’, foram 0.274 ($P>0.10$), -0.723 ($P>0.10$) e 0.094, respectivamente (Tabela 1).

Em *Lizard Island*, foram encontrados valores de h e H_d de 16 e 0.947, respectivamente. O índice de P_i foi 0.05. Quanto aos testes de neutralidade, os índices ‘D de Tajima’, ‘D de Fu e Li’, e ‘F de Fu’, foram respectivamente 0.716 ($P>0.10$), -0.450 ($P>0.10$) e -0.059 (Tabela 1). Como não foram significativos estatisticamente, isso equivale dizer que $D=0$. Quanto ao índice P_i , comparando-se Lizard (0.05), Heron (0.06) e Ningaloo (0.004), observam-se índices semelhantes em Lizard e Heron, sendo esses até 15 vezes maiores que em Ningaloo.

Em *Heron Island*, $h = 6$ e $H_d = 1.0$. Quanto aos testes de neutralidade, os índices ‘D de Tajima’, ‘D de Fu e Li’ e ‘F de Fu’, foram respectivamente 0.095 ($P>0.10$), -0.132 ($P>0.10$) e 0.532 (Tabela 1). Como não são significativos estatisticamente, isso equivale dizer que $D=0$, ou seja, esta população tem evoluído de maneira demograficamente neutra. Para a análise das 7 amostras sequenciadas em *Ningaloo*, foram comparados 674 sítios de pares de base, 7 foram considerados sítios polimórficos, sendo 3 sítios considerados informativos. A relação h/H_d foi 7/1.000. O índice P_i encontrado foi de 0.004. Quanto aos testes de neutralidade, os índices ‘D de Tajima’, ‘D de Fu e Li’ e ‘F de Fu’, foram respectivamente -0.060 ($P>0.10$), 0.075 ($P>0.10$) e -3.642 (Ver Tabela 1). Como não são significativos estatisticamente, isso equivale dizer que $D=0$, ou seja, esta população está evoluindo de maneira neutra.

A figura 4, mostra a rede de parcimônia estatística de haplótipos para as populações de *A. foliacea*. Três redes não conectadas foram obtidas (grupos 1, 2 e 3). Nenhuma das 3 redes é formada por haplótipos exclusivos de uma população específica ou região geográfica mas apresentaram domínio de uma região. Cinco dos seis haplótipos que compõe a rede 1 são exclusivos de *Lizard Island*. Sete de oito haplótipos que compõe a rede 2 são exclusivos de *Ningaloo*; e nove de 12 haplótipos que compõe a rede 3 são exclusivos de *Lizard Island*.

4 DISCUSSÃO

4.1 Respostas aos objetivos específicos do trabalho

4.1.1 Quantas espécies do gênero *Amphiroa* realmente existem na GBC?

Pelos resultados apresentados na árvore filogenética de *Amphiroa* temos identificadas um total de 7 (sete) espécies dentre as amostras: *A. foliacea*, *A. crassa*, *A. anceps*, *A. fragilissima*, *A. gracilis*, *A. exilis*, e *A. tribulus*. No entanto, os resultados indicam que existem outras espécies que ainda não foram identificadas morfológicamente, podendo ser novas espécies, ou, ainda que identificadas morfológicamente são molecularmente diferentes, indicando possivelmente espécies crípticas ou pseudocrípticas (Fig. 2).

4.1.2 Existem espécies novas, crípticas, pseudo-crípticas, criptogênicas ou introduzidas destes 2 gêneros?

Dentre os agrupamentos apresentados na árvore filogenética, temos alguns exemplares que, apesar de terem sido identificados morfológicamente por especialistas mas que molecularmente representam outras espécies (Fig. 2). Temos 5 exemplares que estão nestas condições e provavelmente são espécies crípticas ou, no mínimo, pseudo-crípticas: ADA87975.*Afoli.LIZ* (HARVEY et al., 2013, p.107), ADA88091.*A.foliacea.LIZ* (HARVEY et al., 2013, p.107), PER7029608.*A.foliacea.OneArmPoint* (HARVEY et al., 2013, p.105 e p.106), PER6706274.*A.crassa.OneArmPoint* (registrado no AVH como PERTH6706274), e, por último, AQ708193. *A.foliacea.HER* (HARVEY et al., 2013, p.107).

4.1.3 Qual a relação evolutiva entre elas?

O marcador de *barcode* de DNA não é recomendado para a reconstrução de relações filogenéticas entre espécies, particularmente entre aquelas que possuam grande distância evolutiva. Entretanto, os resultados mostraram a existência de vários complexos de espécies (*A. foliaceae*, *A. crassa*, *A. anceps*, Fig. 2) os quais devem ter seqüências de marcadores mais conservados para terem suas relações evolutivas analisadas com precisão (e.g. *rbcL*). Podemos observar no exemplo do complexo *A. foliaceae* que as 3 espécies molecularmente distintas (pelas divergências nas sequencias de COI) são também filogeneticamente distantes umas das outras (Fig. 2).

4.1.4 Existe estrutura genética entre as populações de uma mesma espécie ao longo da Grande Barreira de Corais Australiana e entre a costas leste e oeste da Austrália?

Três valores encontrados para F_{ST} (0.69, 0.55, e 0.63) são bem altos, indicando a presença de longo isolamento reprodutivo e estruturação genética entre populações. De acordo com o trabalho de HEY & PINHO (2012), valores de F_{ST} acima de 0.35 podem ser indicativos não somente de estruturação, mas de um processo de especiação. Somente entre as populações de *A. foliacea* entre *Lizard* e *Heron* F_{ST} foi zero, ou seja, se comportam como uma única população (Tabela 2). Este padrão observado para *A. foliacea* também foi observado por AYRES & HUGUES (2000, p. 1598) estudando várias espécies de corais, em que o fluxo alélico era suficiente para evitar a diferenciação gênica entre as populações ao longo dos 1800 km de extensão da GBR (Grande Barreira de Corais).

As populações de *A. crassa* entre em *Lizard Island* e *Heron Island* por sua vez apresentaram $F_{ST} = 0.633$. Isso representa um alto grau de diferenciação genética entre estas populações. O valor de N_m (Número de migrantes) está relacionado ao fluxo alélico entre populações, aqui assumindo um valor de 0.29. O baixo valor de N_m indica que praticamente não existe mais fluxo alélico entre as populações de *Heron* e *Lizard*, corroborado pelo alto valor de F_{ST} (Tabela 2). Isto pode ser visualizado pelos grupos 1 e 4 (grupos presentes somente em *Lizard*), grupo 2 (exclusivo de *Heron*) e grupo 3 (com possível origem em *Heron* e posteriormente se irradiando para *Lizard*) da rede de haplótipos de *A. crassa* (Fig.3).

Populações de *A. foliacea* estão presentes tanto no leste (*Lizard* e *Heron*) e oeste (*Ningaloo*) da Austrália. Valor de F_{ST} é igual a zero entre *Lizard* e *Heron*, portanto, não há uma estruturação fazendo com que ambas populações sejam reconhecidas como uma única população (o que é reforçado pelo $N_m=10.41$), ou seja, *panmixia*, um bom exemplo disto pode ser visto no grupo 3, em que a maior parte do agrupamento central está presente em *Lizard* e *Heron*, com mutações se irradiando posteriormente por *Lizard* e *Heron*, presente na rede de haplótipos (Fig. 3). Entre *Lizard* e *Ningaloo*, $F_{ST}=0.688$ e $N_m=0.29$, ou seja, um fluxo alélico muito baixo ou provavelmente inexistente entre elas, suficiente para propiciar um alto grau isolamento genético. Entre *Heron* e *Ningaloo*, $F_{ST}=0.555$, e $N_m=0.40$, indicando também alto grau de diferenciação e baixo fluxo gênico (Tabela 2).

De acordo com TESKE et al. (2016), estudando gastrópodes da costa australiana, a oceanografia atual não explica a presença de barreiras filogeográficas, mas pode servir para manter as barreiras que existiram no passado (TESKE et al., 2016, p.1). Os fatores físicos sendo insuficientes para explicar essas barreiras, poderia ser dado um foco maior no papel dos fatores biológicos como comportamento larval, competição, predação, variáveis de tolerância ambientais espécie específica (TESKE et al., 2016, p.2). BENZIE et al. (1998), estudando a estrutura genética de estrelas-do-mar e alguns gastrópodes presentes no Oceano Índico, Sudeste Asiático, e Oceania, aponta que as maiores descontinuidades genéticas entre as populações dos oceanos Índico e Pacífico indicam divergência em alopatria em tempos em que os mares apresentavam níveis mais baixos e provém evidências para a origem das espécies em dois oceanos, muito mais que na região do sudeste asiático. O fluxo gênico encontrado para uma espécie de gastrópode, *Tridacna maxima*, tem os principais eixos do fluxo gênico perpendiculares às correntes superficiais e paralelas às correntes mais profundas, concluiu-se que os padrões de diferenciação espacial são vestígios de uma dispersão passada e isso não foi alterado pelas condições oceanográficas pelo menos desde o início do Holoceno (6 ka) (BENZIE et al., 1998, p.199). Observando os mapas da plataforma continental australiana (Fig.5), podemos perceber que ao norte, entre as regiões leste e oeste da Austrália, a plataforma é bem rasa, podendo, em tempos passados, em condições com o nível mais baixo dos oceanos, ter isolado as regiões leste e oeste. O mapa da média da amplitude das marés (Fig.6) mostra que ainda hoje, as maiores amplitudes de marés se encontram ao norte da Austrália, devido, também, entre outros fatores, a plataforma ser mais rasa. Observando o mapa das correntes presentes hoje na costa da Austrália (Fig.7), ajuda a entender que as correntes marítimas atuais não facilitam o intercâmbio entre as costas leste e oeste, mas podem facilitar o fluxo alélico ao longo da GBC, portanto, entre as regiões de Lizard Island (ao norte da GBC) e Heron Island (ao sul da GBC). A corrente de Leeuwin, ao sul, chega somente à Tasmânia, somente no verão, em algumas condições, consegue chegar ao sul da GBC (WEBER et al, 2017). Percebe-se que ao longo do litoral da Austrália, a temperatura da superfície do mar (Fig.8), varia bastante latitudinalmente, mais temperado ao sul e tropical ao norte, o que é outro fator que também pode atuar como barreira biogeográfica, impedindo que espécies tropicais consigam vir através da corrente de Leeuwin, vindo da costa oeste para a costa leste em águas tão frias. Em outro trabalho, BENZIE (1999), retomando seu trabalho de 1998, juntando novas análises, mostra que: os padrões de fluxo gênico são discordantes com a

maioria da circulação das correntes de superfície (BENZIE, 1999, p.133); a divergência entre as espécies de coral aconteceram bem antes (7.6 – 23 Ma) que para outras espécies; informações de fósseis de moluscos sugerem que o ambiente recifal foi particularmente condutor para a especiação e portanto, desempenharam um papel importante na geração de biodiversidade; os corais *Symphyllia* e *Coscinarea* vieram do Índico para o sudeste asiático, e o ouriço-do-mar *Echinometra oblonga* teve sua origem no Pacífico e posteriormente alcançou o sudeste asiático (BENZIE, 1999, p.140-143). PHILLIPS (2001), estudando a diversidade de macroalgas na costa australiana também concorda com o que foi encontrado por BENZIE et al. (1998) e BENZIE (1999), afirmando que o alto grau de endemismo é atribuído ao isolamento da Austrália e sua manutenção se deve pela falta de eventos de extinção em massa recentes. Esta falta de eventos de extinção em massa recentes é corroborado pelos dados encontrados por este trabalho, o único evento mais recente encontrado foi um possível *recent sweep*, ou um *bottleneck* em *Heron Island* para *Amphiroa crassa*.

4.2 Limitações do trabalho

As coletas das amostras não foram igualmente distribuídas ao longo da costa australiana, o que pode ter prejudicado as análises. Seria interessante que, além da utilização do marcador ‘COI’, tivéssemos também outro marcador para as mesmas amostras, como o ‘rbcL’, para realizar estudos filogenéticos mais robustos sobre a evolução das espécies de *Amphiroa*.

4.3 Consequências ecológicas e acadêmicas

Os resultados corroboram a grande diversidade biológica presente na GBR da Austrália e, nesta região, a região de *Lizard Island* tem grande importância para a conservação devido ao fato de ter apresentado a maior riqueza de espécies e maiores índices de diversidade genética entre todas as populações amostradas.

De acordo com WILLIAMS et al. (2008), o início da metamorfose de muitos invertebrados e a sua fixação (colonização) está fortemente ligado ao ambiente. Algas coralináceas (Coralinaceae, Rhodophyta) estão relacionadas ao assentamento de larvas de equinodermos, vermes anelídeos, alguns tipos de coral e até mesmo de esponjas (WILLIAMS et al, 2008, p.98-99). Por sua habilidade em induzir larvas à metamorfose,

colonização ou ambos, as algas coralíneas desempenham um papel crucial no ciclo de vida de diversos invertebrados marinhos pelagobênticos. A diminuição da diversidade e abundância de tais algas pode ter um efeito catastrófico na diversidade e abundância de muitas outras espécies que dela dependem (WILLIAMS et al, 2008, p.104).

Como consequências acadêmicas, penso que este trabalho, revelando novas espécies e corroborando o posicionamento de outras já descritas, demonstra as novas possibilidades concernentes à sistemática molecular.

4.4 Recomendações para o futuro

Recomenda-se a continuidade dos estudos de *Amphiroa* e outras algas coralíneas ao longo da costa australiana, coletando mais exemplares, realizando análises com mais de um tipo de marcador, cruzando resultados sobre a biogeografia de *Amphiroa* com outras espécies de invertebrados que tenham seu ciclo de vida a ela relacionados, assim aprofundando o conhecimento da biogeografia de toda a região. Além da costa australiana, o mesmo delineamento de estudo poderia ser realizado na costa do Brasil, já que aqui também temos exemplares de *Amphiroa* e outras algas coralíneas.

BENZIE (1999, p.143), estudando a estrutura dos corais de recife australianos, comparando a estrutura genética destes com a de outros animais como estrelas-do-mar e alguns gastrópodes afirma que, se a biodiversidade presente nos recifes de coral vai se manter ou não no futuro pode ser espelhado no passado. Mas, com o presente cenário de aumento do CO₂ atmosférico, aumento das temperaturas médias globais, a acidificação dos oceanos, a diminuição dos níveis de calcificação no mar, e impactos causados pelo homem, podemos esperar mudanças marcantes na natureza e no padrão da diversidade dos organismos recifais. Então, recomendamos que futuras pesquisas continuem monitorando essa biodiversidade.

FIGURAS

Figura 1 - Mapa da Austrália com as localidades onde foram coletadas as amostras.



Fonte: Imagens do Google.

Figura 2 - Árvore filogenética encontrada para o gênero *Amphiroa* na Austrália.

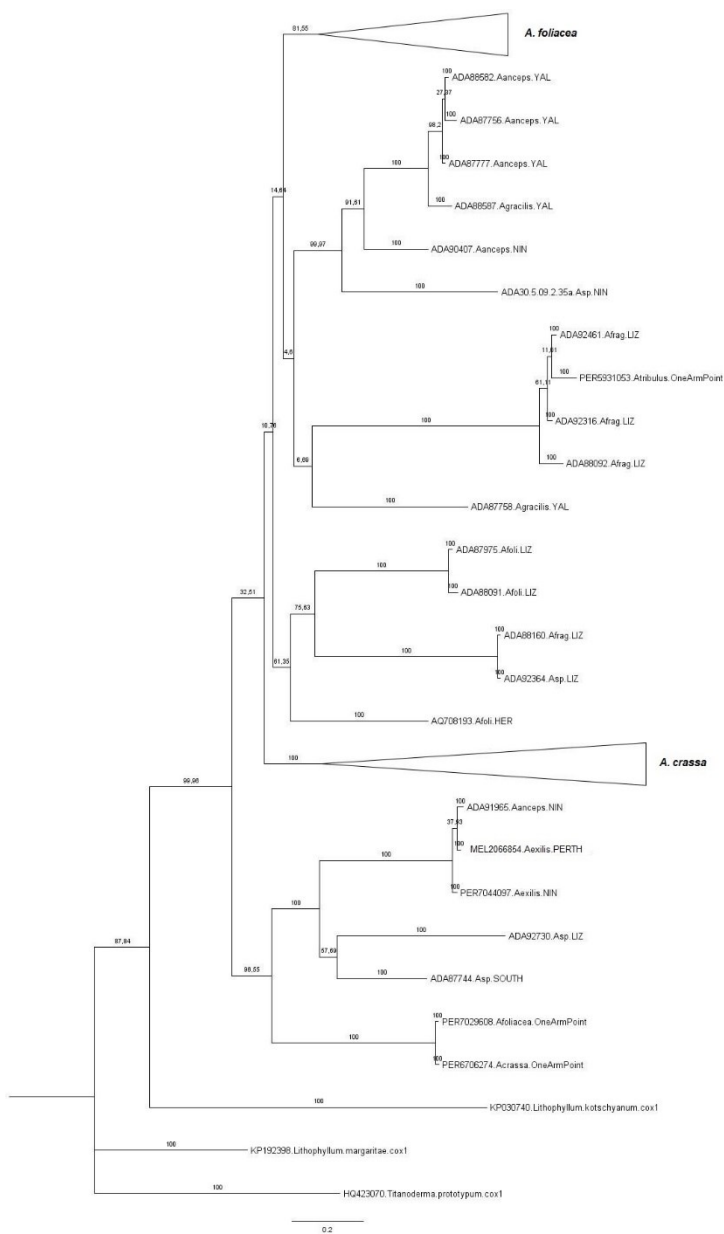


Figura 3 - Rede de haplótipos de *Amphiroa crassa*.

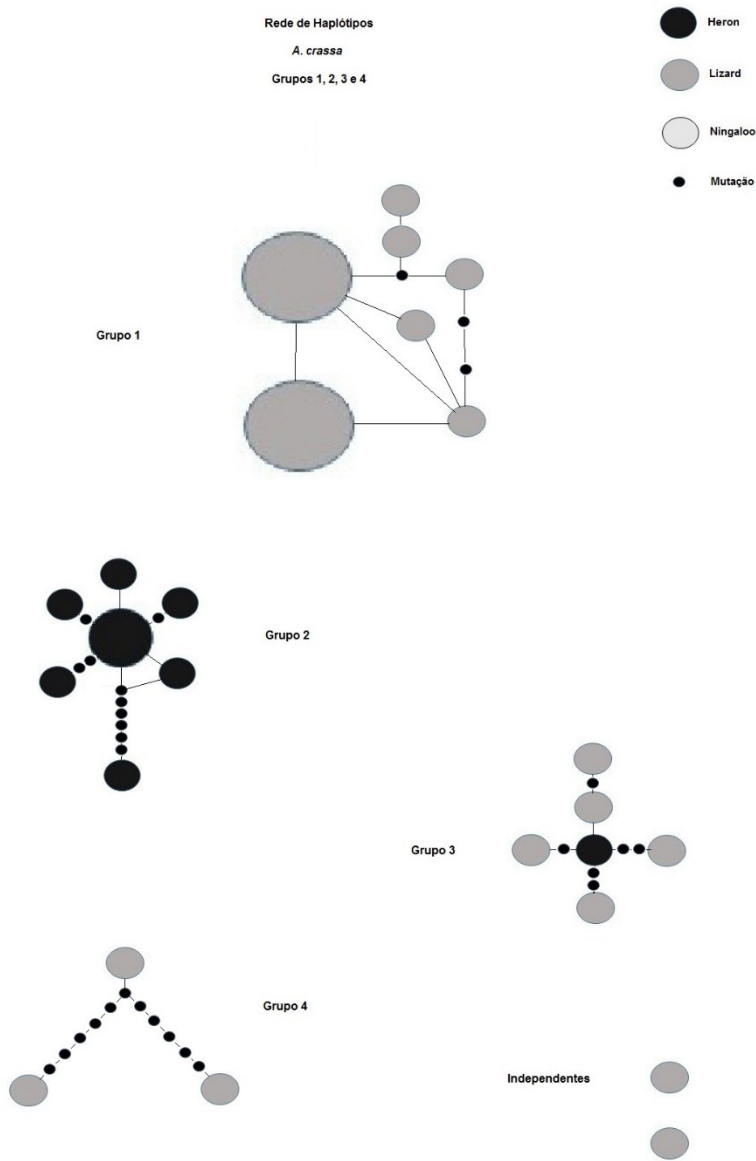


Figura 4 - Rede de haplótipos de *Amphiroa foliacea*

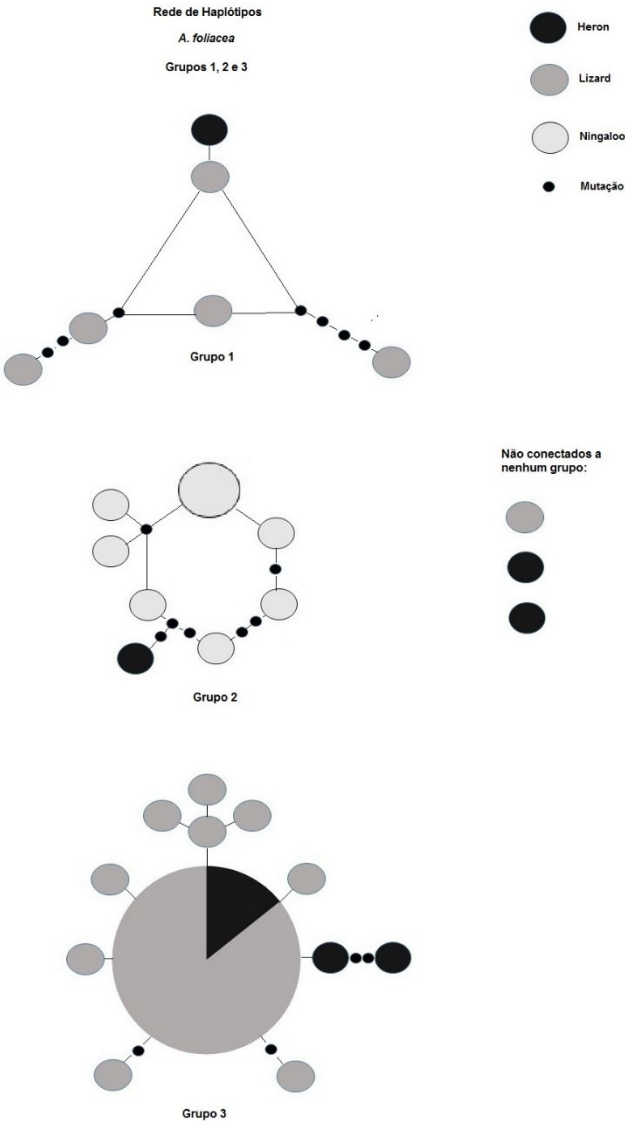
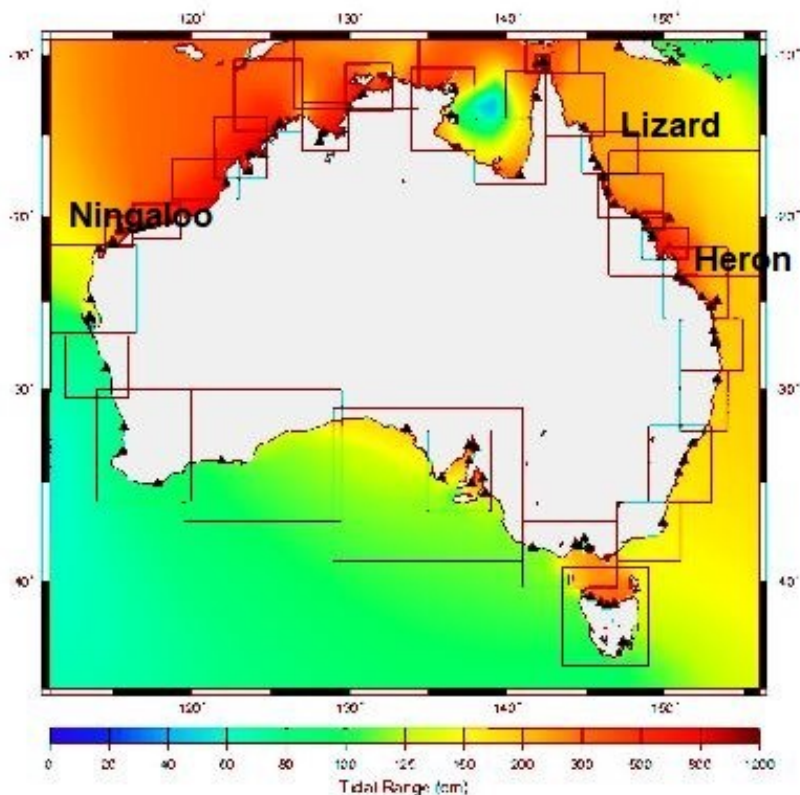


Figura 5 - Mapa da plataforma continental da Austrália.



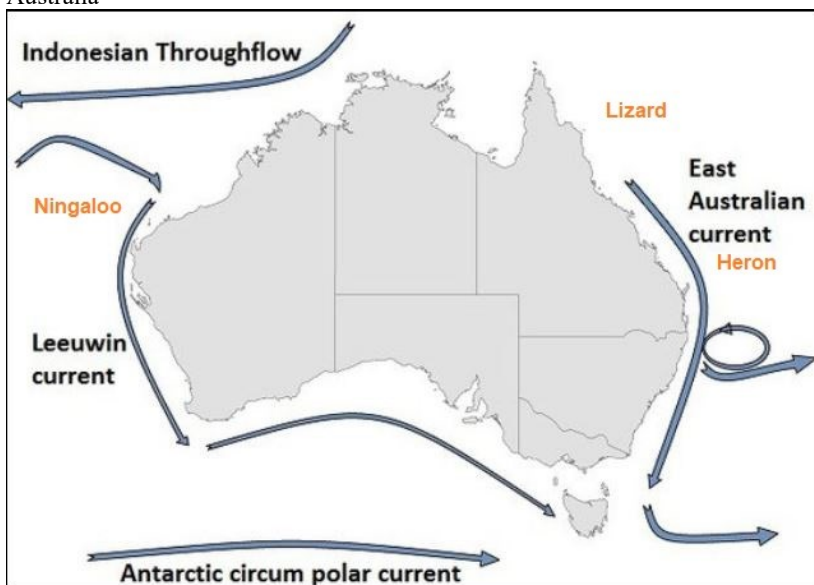
Fonte: *The Australian Government Bureau of Meteorology*
<<http://www.bom.gov.au/marine/averages-trends.shtml>>)

Figura 6 - Mapa da média das amplitudes das marés na costa da Austrália. Quanto mais em vermelho, maior a amplitude. A escala vai de 0 (em azul) até 200 cm (em vermelho escuro).



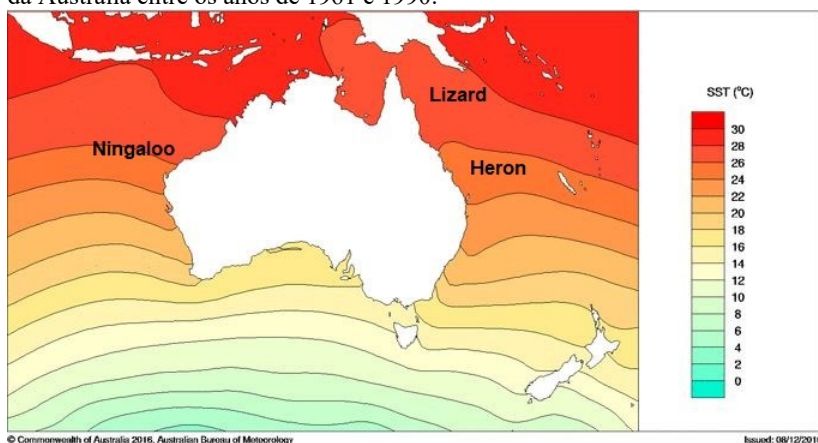
Fonte: The Australian Government Bureau of Meteorology
<<http://www.bom.gov.au/marine/averages-trends.shtml>>

Figura 7 - Mapa com a configuração das correntes marinhas na costa da Austrália



Fonte: *The Australian Government Bureau of Meteorology*
<<http://www.bom.gov.au/marine/averages-trends.shtml>>

Figura 8 - Mapa com a média das temperaturas na superfície do mar ao redor da Austrália entre os anos de 1961 e 1990.



Fonte: *The Australian Government Bureau of Meteorology*
<<http://www.bom.gov.au/marine/averages-trends.shtml>>

TABELAS

Tabela 1 - Índices de diversidade genética por população de *Amphiroa crassa* e *A. foliacea* (algas marinhas vermelhas) calculados pelo software DnaSP

Espécie	LOCAL	N	S	Pi	h / Hd	Θ _S Theta (from S)	Θ Theta (from Eta)	Tajima's D	Fu & Li's D	Fu's F
<i>Amphiroa crassa</i>	LIZ	22	92	0.060	14 / 0.931	28.636	27.158	0.827 P>0.10	-0.098 P>0.10	3.307
	HER	11	76	0.028	6 / 0.727	69.091	26.972	-2.164 P<0.01	-2.581 P<0.02	3.981
	NIN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TOTAL	33	119	0.085	19 / 0.936	26.182	33.756	1.191 P>0.10	0.443 P>0.10	5.293
<i>Amphiroa foliacea</i>	LIZ	20	86	0.050	16 / 0.947	24.241	30.400	0.716 P>0.10	-0.450 P>0.10	- 0.059
	HER	6	69	0.061	6 / 1.000	30.219	32.500	0.095 P>0.10	-0.132 P>0.10	0.532
	NIN	7	7	0.004	7 / 1.000	2.857	3.429	-0.060 P>0.10	-0.030 P>0.10	- 4.892
	TOTAL	33	88	0.060	23 / 0.958	21.683	29.091	-0.512 P>0.10	-0.661 P>0.10	0.094

Legenda: N: número de indivíduos; S: número de sítios polimórficos; Pi: diversidade de nucleotídeos; h: número de haplótipos; Hd: diversidade de haplótipos; Theta (θ) = $2N\mu$; Tajima's D (TAJIMA, 1993); Fu & Li's D (FU & LI, 1993); Fu's F (FU, 1997).

Tabela 2 - Análise de isolamento genético entre populações (F_{ST}) e estimativa de fluxo gênico entre estas (N_m) (HUDSON et cols, 1992). *Amphiroa crassa* (em azul, diagonal superior), *Amphiroa foliacea* (em verde, diagonal inferior).

	LIZ	HER	NIN
LIZ	0	F_{ST} : 0.63 N_m : 0.29	-
HER	F_{ST} : 0.00 N_m : 10.41	0	-
NIN	F_{ST} : 0.69 N_m : 0.24	F_{ST} : 0.55 N_m : 0.40	0

REFERÊNCIAS

AVH. Australia's Virtual Herbarium. Acesso em <<http://avh.ala.org.au>>

AVISE, John C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, v. 18, n. 1, p. 489-522, 1987.

AYRE, David J.; HUGHES, Terence P. Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. **Evolution**, v. 54, n. 5, p. 1590-1605, 2000.

BENSON, Dennis A. et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D36-D42, 2013.

BENZIE, J. A. H. et al. Genetic structure of marine organisms and SE Asian biogeography. **Biogeography and geological evolution of SE Asia**, v. 30, p. 197-209, 1998.

BENZIE, John AH. Genetic structure of coral reef organisms: ghosts of dispersal past. **American Zoologist**, v. 39, n. 1, p. 131-145, 1999.

BUENO-SILVA, Marlus. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia**, v. 34, n. 83, p. 157-163, 2012.

CLEMENT, Mark; POSADA, D. C. K. A.; CRANDALL, Keith A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000.

COORDINATORS, NCBI Resource. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D8, 2013.

DARRIBA, Diego et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B., Buxton, S.; CHEUNG, M.;

COOPER, A.; DURAN, C.; MOIR, R.. **Geneious v5. 4.**, 2011.

DUPONT, Sam; DOREY, Nathan; THORNDYKE, Michael. What meta-analysis can tell us about vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 89, n. 2, p. 182-185, 2010.

FLOETER, R. S.; SOARES-GOMES, A.; HAJDU, E. Biogeografia marinha. **Biologia, Marinha edn. Interciência, Rio de Janeiro**, p. 421-441, 2009.

FU, Y.X.; LI, W.H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v.133, p. 693-709, 1993.

FU, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147: 915-925.

GUINDON, Stéphane et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
<http://www.algaebase.org>;
 <http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=r9facef3001b8d7e1> searched on 19 October 2017.

GULBRANSEN, Dana J. et al. Gracilaria vermiculophylla (Rhodophyta, Gracilariales) in the Virginia coastal bays, USA: COX1 analysis reveals high genetic richness of an introduced macroalga. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 5, p. 1278-1283, 2012.

HARVEY, A. S. et al. A monographic account of Australian species of Amphiroa (Corallinaceae, Rhodophyta). **Australian Systematic Botany**, v. 26, n. 2, p. 81-144, 2013.

HASEGAWA, Masami; KISHINO, Hirohisa; YANO, Taka-aki. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of molecular evolution**, v. 22, n. 2, p. 160-174, 1985.

HENDRIKS, Iris E.; DUARTE, Carlos M.; ÁLVAREZ, Marta. Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: a meta-

analysis. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 86, n. 2, p. 157-164, 2010.

HEY, Jody; PINHO, Catarina. Population genetics and objectivity in species diagnosis. **Evolution**, v. 66, n. 5, p. 1413-1429, 2012.

HIND, Katharine R.; SAUNDERS, Gary W. A molecular phylogenetic study of the tribe Corallineae (Corallinales, Rhodophyta) with an assessment of genus-level taxonomic features and descriptions of novel genera. **Journal of phycology**, v. 49, n. 1, p. 103-114, 2013.

HOEGH-GULDBERG, Ove et al. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1737-1742, 2007.

HU, ZI-MIN et al. Phylogeographic heterogeneity of the brown macroalga *Sargassum horneri* (Fucaceae) in the northwestern Pacific in relation to late Pleistocene glaciation and tectonic configurations. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 18, p. 3894-3909, 2011.

HUDSON, R. R., M. KREITMAN and M. AGUADE. A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. **Genetics** vol. 116, p. 153-159, 1987.

HUDSON, R. R., M. SLATKIN and W. P. MADDISON. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. **Genetics**, v. 132, p. 583-589, 1992

KUFFNER, Ilsa B. et al. Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification. **Nature Geoscience**, v. 1, n. 2, p. 114-117, 2008.

LAMOUROUX, J. V. F. Extrait d'un mémoire sur la classification des Polypiers coralligènes non entièrement pierreux. **Nouveau Bulletin des Sciences, par la Société Philomatique de Paris**, v. 3, n. 63, p. 181-188, 1812.

MARTIN, Sophie; GATTUSO, JEAN-PIERRE. Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature. **Global Change Biology**, v. 15, n. 8, p. 2089-2100, 2009.

MARTINS, F. de M.; DOMINGUES, M. V. Filogeografia. Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos. São Paulo: Editora Roca, p. 1-17, 2011.

McDONALD, J. H. and M. KREITMAN. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. **Nature**, v.351, p.652-654, 1991.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. The CIPRES science gateway. In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. p.1-8, 2010.

MIRANDA, Thaís Pires; MARQUES, Antonio Carlos. Abordagens atuais em biogeografia marinha. **Revista da Biologia**, 2011.

PALUMBI, Stephen R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. **Annual review of ecology and systematics**, v. 25, n. 1, p. 547-572, 1994.

PHILLIPS, Julie A. Marine macroalgal biodiversity hotspots: why is there high species richness and endemism in southern Australian marine benthic flora? **Biodiversity and Conservation**, v. 10, n. 9, p. 1555-1577, 2001.

RAMBAUT, A. **FigTree**, version 1.3. 1. Computer program distributed by the author, website: <http://treebioedacuk/software/figtree/> [accessed January 4, 2011], 2009.

RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROZAS, Julio et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.

SAUNDERS, Gary W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1879-1888, 2005.

TAJIMA, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p.585-595.

TAMURA, K. et al. MEGA6: 466 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, p. 467, 2013.

TESKE, P.R. et al. An overview of Australia's temperate marine phylogeography, with new evidence from high-dispersal gastropods. **Journal of Biogeography**, p.1-13, 2016. Acesso em <
<http://wileyonlinelibrary.com/journal/jbi> 1 doi:10.1111/jbi.12783>

TORRANO-SILVA, Beatriz Nogueira. **Taxonomia e filogenia de Lithophylloideae (Rhodophyta) no Brasil**. 2015. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-02102015-114647/>>. Acesso em: 2016-07-20.

WEBER, Xénia A. et al. A morphological and phylogenetic investigation into divergence among sympatric Australian southern bull kelps (*Durvillaea potatorum* and *D. amatheiae* sp. nov.). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 107, p. 630-643, 2017

WILLIAMS E. A. et al. Articulated coralline algae of the genus *Amphiroa* are highly effective natural inducers of settlement in the tropical abalone *Haliotis asinina*. **Biological Bulletin**, vol.215, n.1, p.98-107, 2008.

WOMERSLEY, H. B. S. The marine benthic flora of Southern Australia, Rhodophyta-Part IIIB. **Flora of Australia supplementary series**, v. 5, 1996.